

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 62-081566

(43)Date of publication of application : 15.04.1987

(51)Int.Cl. G01N 33/543
G01N 21/64

(21)Application number : 60-221949

(71)Applicant : SHOWA DENKO KK

(22)Date of filing : 07.10.1985

(72)Inventor : MIZUKOSHI TATSUYA
FUKUI KATSUJI

(54) QUANTIFICATION METHOD BY MEASUREMENT OF FLUORESCENT INTENSITY OF FINE PARTICLE

(57)Abstract:

PURPOSE: To make it possible to simultaneously quantify a plurality of substances, in a fluorescent immunoassay using a solid phase, by allowing fine particles different in a particle size to respectively support different responsive substances.

CONSTITUTION: Particles are classified, for example, into three kinds in a particle size and three kinds in the presence and absence of the adhesion of a fluorescent dye to form 6 kinds of groups in total. Reagents prepared by respectively supporting 6 kinds of antibodies by the particles of six groups are contacted with a mixture of a specimen solution and a definite amount of a standard substance labelled with a substance different from the aforementioned fluorescent dye and competition reaction is allowed to generate to prepare measuring solutions which are, in turn, measured by a known flow sight meter together having colter volume measuring function and fluorescent intensity measuring function to make it possible to discriminate the groups. The quantity of a substance to be measured is measured by measuring the fluorescent intensity of the fluorescent substance labelled with the standard substance. By this method, the concn. of the substance to be measured at every group can be measured.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-81566

⑤ Int.Cl.⁴

G 01 N 33/543
21/64
33/543

識別記号

庁内整理番号

D-7906-2G
7458-2G
G-7906-2G

⑬ 公開 昭和62年(1987)4月15日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全6頁)

⑭ 発明の名称 微粒子の螢光強度測定による定量方法

⑮ 特 願 昭60-221949

⑯ 出 願 昭60(1985)10月7日

⑰ 発 明 者 水 越 達 也 東京都大田区多摩川2-24-25 昭和電工株式会社総合技術研究所内

⑱ 発 明 者 福 井 勝 治 東京都大田区多摩川2-24-25 昭和電工株式会社総合技術研究所内

⑲ 出 願 人 昭和電工株式会社 東京都港区芝大門1丁目13番9号

⑳ 代 理 人 弁理士 菊地 精一

明 細 書

1. 発明の名称

微粒子の螢光強度測定による定量方法

2. 特許請求の範囲

1. 検体中に含まれている n 種の被測定物質のそれぞれの量を、被測定物質のそれぞれと特異的に結合する n 種の感応物質を担持させた微粒子を担体として利用して測定する方法であって、粒径の大きさによって及び／又は螢光物質による標識づけによって n 種に判別できる該微粒子を担体として用い、各々の種類の担体にそれぞれの被測定物質と特異的に結合する前記 n 種の感応物質をそれぞれ担持させたものを試薬とし、検体中の n 種の被測定物質を標準物質として前記螢光物質とは異なった種類の螢光物質により螢光標識し、螢光標識された標準物質のそれぞれの一定量と検体との混合物を前記試薬に接触させ、感応物質に対する被測定物質と螢光標識された標準物質の競合反応を起させ、微粒子の螢光強度を測定することを特徴とする微粒子の螢光強度測定による定量方法。

2. 特異的な結合が抗原・抗体反応であること
を特徴とする特許請求の範囲第1項記載の方法。

3. 微粒子の螢光強度を、フローサイトメトリによって測定することを特徴とする特許請求の範囲第1項又は第2項記載の方法。

3. 発明の詳細な説明
(産業上の利用分野)

本発明は、物質同志の特異的な結合、例えば抗原・抗体反応を利用した定量方法に関する。

(従来の技術)

医療分野における微量分析の手法として免疫学的反応を利用した測定法は、すでに定着しており、その中でも主流はラジオイムノアッセイ(RIA)である。RIAは、1959年パーソン、ヤロウらによって、インスリンの測定法として開発されたのが最初であり、その後爆発的に普及した。しかしラジオアイソトープの取り扱い、専用の設備、廃棄の際の安全性などの問題、あるいは標識化合物の寿命等も従来からクローズアップされており、非放射性的の標識法についての研究がさかんに行わ

れてきた。感度的に匹敵するものとして1971年にエンザイムイムノアッセイ (EIA) が登場し、RIA に代わるものとして注目を浴びてきた。確かに測定項目によってはRIA と同程度、あるいはそれ以上の感度を持つことが報告されているし、RIA とは違い抗原抗体結合型と遊離型との分離いわゆる B/F 分離の必要がないホモジニアスな系での測定も可能であるという特長があるが生物学的反応を用いるといった不安定な要素や、相対的に見た感度、煩雑さなどの問題もあり、今一つ RIA にとって代わるだけのものがないのが現状であろう。ラジオアイソトープの代わりに蛍光プローブを用いたのが蛍光イムノアッセイ (FIA) である。感度的には、RIA に今一步およばないが、安全性の点で問題がなく RI と同様の原理で使用できる上に、B/F 分離の必要がないホモジニアスな系での測定も可能なため、欧米諸国では非常によく利用されている。

医療分野において、疾病の発生、進行度、治療効果等を知る上での特定の生体内物質 (マーカー)

の蛍光活性を分析することを特徴としており、その要旨は検体中に含まれている n 種の被測定物質のそれぞれの量を、被測定物質のそれぞれと特異的に結合する n 種の感応物質を担持させた微粒子を担体として利用して測定する方法であって、粒径の大きさによって及び/又は蛍光物質による標識づけによって n 種に判別できる該微粒子を担体として用い、各々の種類の担体にそれぞれの被測定物質と特異的に結合する前記 n 種の感応物質をそれぞれ担持させたものを試薬とし、検体中の n 種の被測定物質を標準物質として前記蛍光物質とは異なった種類の蛍光物質により蛍光標識し、蛍光標識された標準物質のそれぞれの一定量と検体との混合物を前記試薬に接触させ、感応物質に対する被測定物質と蛍光標識された標準物質の競合反応を起させ、微粒子の蛍光強度を測定することによって特徴とする微粒子の蛍光強度測定による定量方法を提供することにある。

ここで、 n は、自然数であるが、2 以上の自然数の場合に特に顕著な効果を発揮する。

の変化は非常に重要な意味を持つ。例えば腫瘍マーカーならば、CA-125, CA-19-9, AFP, CEAなどを始めとして、かなりの数が知られているが、すべての腫瘍に共通で、しかも早期発見の手助けとなるようなマーカーは現在までに知られていない。したがって、検査する際、腫瘍存在の可能性、発生部位等を正確に把握するためには、多項目のマーカーについて検査し、総合的に判断するしかたで代てがない。ところが現状では、複数のデータが知りたい場合、その数だけ測定を行うしかなく、採血の際の患者の苦痛、検査のために要する手間、時間が増大するばかりであった。

(発明が解決する問題点)

本発明は、上記問題点を解決するためになされたものであり、これまでの FIA では困難であった、検体中の被測定物質の量を、正確に測定する方法を提供することを目的とする。

(問題点を解決するための手段及び作用)

本発明は固相を用いた FIA の競合法の改善であり、固相として微粒子を用い、その粒子一つ一つ

物質同志の特異的な結合反応の代表的なものは、抗原抗体反応であるが、それ以外にもホルモンとレセプター、糖とレクチンなどの反応も利用が可能である。

抗原抗体反応を例にとり、さらに詳しく説明する。測定対象が抗原となり得るもの (ハプテン等も含む) であれば、それに対応する抗体を微粒子に担持させておく。測定対象によっては、抗原・抗体が逆の組み合わせでもよい。

本発明では、複数の物質を、同時に定量する為に微粒子 (1~100 μ 程度の粒径のそろったもの) を予め、複数のグループに判別できるように構成しておく。その方法の一つは、粒径を複数のレベルにそろえておくことである。また粒子を蛍光物質で標識づけする場合、蛍光物質の有・無又は濃度、蛍光の種類などにより、複数のグループに判別できる。そして、両者を組み合わせることにより、さらに多くの粒子群の判別が可能である。

尚、標準物質を蛍光物質によって標識づけする際に、複数種類の蛍光物質 (例えば FITC

(Fluorescein Isothiocyanate) と PI (Propidium Iodide) など) を使用すれば、これにより被測定物質の種類判別と定量が可能であり、このような方法も本発明の技術的範囲に入ることはいうまでもない。

微粒子としては、例えば赤血球などの細胞、金属、リボソームなどのマイクロカプセル、ポリスチレン等のラテックス粒子等で、粒径 $1 \sim 100 \mu$ 程度のものが利用できる。

微粒子に所定の感応物質、例えば抗体を担持させるには物理的に吸着させる方法、微粒子上の官能基を利用して化学的に結合させる方法などが知られている。

感応物質とは、被測定物質と特異的に反応する物質をいい、被測定物質が抗原である場合には、その抗原と特異的に反応する抗体である。前述のように、被測定物質の種類により、ホルモンとレセプター、糖とレクチンなども利用できる。

抗体-抗原反応利用を例に本発明の作用を説明する。理解を容易にするためにまず $n=1$ を例に

と表わし、それに対応する蛍光標識された標準物質及び抗体を、それぞれ $(A_1^* \dots A_n^*)(B_1 \dots B_n)$ とすれば、 $(A_1, A_1^*, B_1) \dots (A_n, A_n^*, B_n)$ について同様の関係となり、上記と同じ原理で、 $(A_1 \dots A_n)$ の量が測定できる。

但し被測定物質によっては、抗原と抗体の関係が逆になる。

A_1, \dots, A_n のグループ分けは、 B_1, \dots, B_n を担持させる微粒子を予め、複数のグループに判別できるように構成しておく。その方法の一つは、粒径を複数のレベルにそろえておくことである。本発明では、個々の粒子の蛍光強度を測定するのでそのためには、微粒子の径は、そろえておく必要がある。微粒子の粒径を、例えば 5μ のもの (a グループ) と、 10μ (b グループ) のものを使用すれば、a グループと b グループは、公知の方法で十分判別できる。また粒子を蛍光物質で標識づけする場合、蛍光物質の有・無又は濃度、蛍光の種類などにより複数のグループに判別できる。さらに、標準物質を蛍光づけする際、複数の

として説明する。

一定粒径の微粒子に特定の抗体を担持する。一方、検体中の被測定物質と同一の物質を標準物質とし (例えば検体中の被測定物質が、免疫グロブリン A である場合は、IgA を標準物質とする)、IgA の一定量に蛍光標識をつけたものを用意し、これを検体と混合する。この混合液中には、被測定物質 (以下 A という) と、蛍光標識づけされた一定量の標準物質 (以下 A^* という) とが共存する。A 及び A^* は、微粒子に担持された抗体 (以下 B という) に対し、同様の抗原・抗体反応をおこす。従って、混合液と試薬とを接触させると、A と A^* とは、競合して B と抗原・抗体反応をおこす。 A^* と B とは、一定量であるから、A の量が少ない程 A^* が多く B と結合することになり、粒子の蛍光量は多くなる。逆に A の量が多いと、粒子の蛍光量は少ないことになる。この原理から、粒子の蛍光量を測定することにより、A の量を知ることができる。

被測定物質が n 種あるときこれを $(A_1 \dots A_n)$

蛍光物質を使用すれば、これによっても、最終的には微粒子の判別ができる。そして、これらの組み合わせにより、さらに多くの粒子群の判別が可能である。

なお、本発明については、粒子どうしの非特異的な凝集、あるいは抗原抗体反応による凝集を極力防がねばならず、そのために単クローン性抗体を用いるが、機械的な刺激によって簡単に分散するような比較的大きな粒子を用いるとか、或いは粒子濃度を稀薄にしておくことが好ましい。

微粒子のグループの判別法、蛍光強度の測定法には、顕微鏡測光なども利用できるが、好ましい実施態様の一つとしては、これらの粒子を一つずつ、フローサイトメトリー法で測定する方法を挙げることができる。

フローサイトメトリー法とは、主として光学機器分析に関するものであり粒子を1個ずつ流し、粒子にレーザー光などをあてて、その散乱光を測定することにより、粒子の大きさ、色、或いは、予め粒子を蛍光物質等で標識づけしておき、その

蛍光強度測定等により粒子の形質を測定するものである。又、いわゆるコウルターの原理により、粒子の容量（コウルターボリュームという）を電氣的に測定する方法によるもの、これと光学測定とを合わせたものも利用されている。

粒子を n 個のグループへ判別するには、例えば粒子径で 3 グループ、蛍光色素を付着したものとさせない粒子とを調整すれば合計 6 グループの粒子を調整できる。この場合、6 種の抗体を各グループの粒子にそれぞれ担持させた試薬を、検体溶液と前記蛍光物質とは異った種類で標識づけされた標準物質の一定量との混合物と接触させ、競合反応をおこさせた測定液を、コウルターボリューム測定機能と蛍光強度測定機能とを併せもった公知のフローサイトメーターで測定すると、粒子径と粒子につけた蛍光の有無とにより粒子のグループ分けが出来る。

被測定物質の量は、標準物質を標識づけした蛍光物質の蛍光強度測定により行われる。両蛍光物質は、蛍光強度測定の前波長を選定することにより

約 1 時間ゆるやかに振盪する。その後、遠心分離により反応液を完全に取り除き 3 ml の PBS に懸濁する。この懸濁液をセルアナライザーによって分析し、第 1 図に示す様な検量線を得た。縦軸は 100,000 個の粒子を分析した際の、最も数が多かった蛍光強度（ピーク値）と、全体の蛍光活性の平均値である。

（実施例 2）

ヒト IgG, IgM の同時測定

(i) 試薬の調整

a. ヒト IgG 分析用試薬

ポリスチレンビーズ（5.29 μm ）の固型分 5 mg をホウ酸緩衝食塩水（BBS pH 8.2）2.5 ml に懸濁させ、0.2 mg/ml のアフィニティー精製した抗ヒト IgG 抗体（ヤギ）2.5 ml と混合する。室温で 2 時間、4℃で一晩ゆるやかに攪拌した後、遠心分離し、PBS（1% BSA）5 ml に懸濁し 0.1% のラテックス試薬を得る。

b. ヒト IgM 分析用試薬

ポリスチレンビーズ（10 μm ）、抗ヒト IgM の

區別され、 A_i の濃度が、微粒子のグループ毎即ち被測定物質ごとに測定できる。

尚、このグループ分けには、特願昭 60 - 130882 に示されている方法が利用できる。

（実施例 1）

(1) ヒト血清アルブミン（HSA）の測定

(i) 試薬の調整

ポリスチレンビーズ（平均粒径 5.29 μm ）固型分として 5 mg を 5 ml のリン酸緩衝食塩水（PBS pH 7.4）に懸濁する。それに 10 倍希釈した抗 HSA ヤギ抗血清 5 ml を加え、室温で 6 時間ゆるやかに攪拌した後、4℃で 1 晩ゆるやかに攪拌する。そして、遠心分離にて洗浄した後、保護コロイドとして 1% の牛血清アルブミンを含む PBS 5 ml に懸濁し、固型分 0.1% のラテックス試薬として試験に供する。

(ii) 検量線の作成

異なる濃度の HSA を含む標準液 100 μl に FITC 標識の HSA（10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を 100 μl ずつ加える。この混合液に試薬を 100 μl 加えたのち、

アフィニティー精製抗体（ヤギ）を用いて、a と同様の操作を行い、最終的に 0.2% のラテックス試薬 5 ml を得る。

(iii) 検量線の作成

① FITC 標識の IgG, IgM、各々 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む混合液

② (i) - a, b で調整した試薬の等量混合物。

③ 各々異なる濃度の IgG, IgM を含む標準液。

①, ③ を 100 μl 、② を 200 μl 混合し 2 時間の反応の後遠心分離し、PBS に再懸濁し、セルアナライザーで分析する。すなわちコウルターの原理により、5.29 μm と 10 μm のビーズは完全に區別され、その各々のビーズについて、蛍光活性を調べるわけである。分析結果を第 2 図に示す。（効果）

本発明の方法により、検体中に含まれる 1 又は複数の被測定物質を同時に正確に測定できる。

この分析の好ましい実施態様は微粒子の大きさ、蛍光活性の同時測定をする機能をもつフローサイトメトリー（FCM）の利用である。FCM を利用す

ることによって、粒径の差、粒子自体に持たせた
 螢光色素の種類、量の差、等により微粒子を区別
 し、その各々について、抗原抗体反応に起因する
 螢光活性を測定することが可能になり、結果とし
 て同時多項目の測定が可能になる。

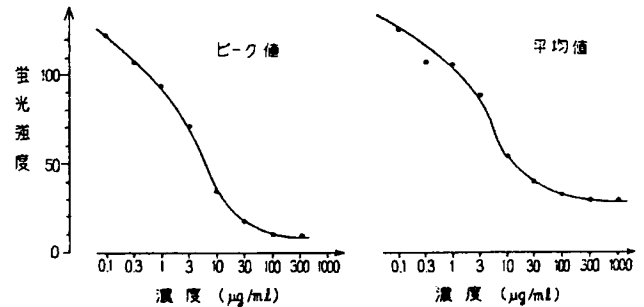
こうして同時複数項目の測定が可能になると、
 総合的な診断をする上で大きな手助けになり、偽
 陽性、偽陰性のような誤診断の減少、また各疾患
 の早期発見などに大きく寄与するであろう。

4. 図面の簡単な説明

第1図はHSAの濃度と螢光強度との関係、

第2図は、IgG及びIgMの濃度と螢光強度との
 関係を示す測定例のグラフである。

第1図



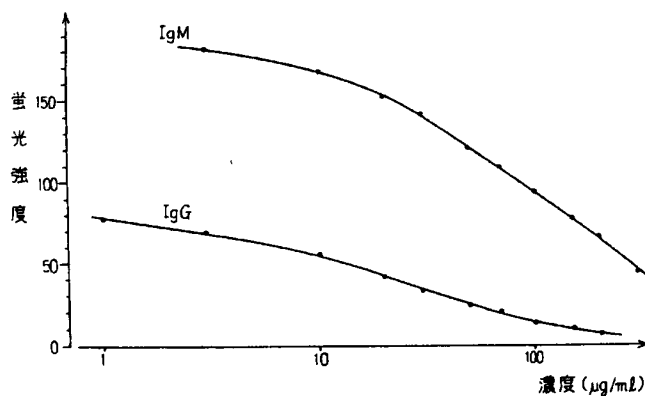
特許出願人 昭和電工株式会社
 代理人 弁理士 菊地 精一

手続補正書(自発)

昭和61年 2月 6日

特許庁長官 宇賀 道郎 殿

第2図



1. 事件の表示

昭和60年特許願第221949号

2. 発明の名称

微粒子の螢光強度測定による定量方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 東京都港区芝大門一丁目13番 9号

名称 (200) 昭和電工株式会社

代表者 岸 本 泰 延

4. 代理人 (郵便番号 105)

居所 東京都港区芝大門一丁目13番 9号

昭和電工株式会社内

電話 東京 432-5111番 (大代表)

氏名 (7037) 弁理士 菊地 精一

5 . 補正の対象

明細書の「発明の詳細な説明」の欄。

6 . 補正の内容

- (1) 第2頁下から第4行目「ラジオアイソトープ」の後に『(RI)』を追加する。
- (2) 第4頁第2行目の「AFP」を『 α -フエトプロテイン(AFP)』に訂正する。
- (3) 第4頁第2行目の「CEA」を『胎児性癌抗原(CEA)』に訂正する。
- (4) 第10頁第8行目の「を用いるが」を『を用いるか』に訂正する。
- (5) 第13頁第3行目と第14頁第10行目から第11行目の「セルアナライザー」を『フローサイトメトリー法』に訂正する。